

小菜蛾对定虫隆的抗性生化机制初探*

吴青君** 朱国仁 赵建周***

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

张 兴

高希武

(西北农业大学, 杨陵 712100) (中国农业大学昆虫学系, 北京 100094)

摘要 以定虫隆汰选的抗性指数为23.78倍抗性种群(CH-R), 并以上海田间种群(SH-R, 对定虫隆的抗性指数为9.16倍)作为参比种群, 研究小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 对定虫隆的抗性机制, 结果表明: CH-R种群多功能氧化酶O-脱甲基活力比相对敏感种群(SZ-S)提高1倍, 而SH-R种群多功能氧化酶O-脱甲基活力虽有所提高, 但与SZ-S种群相比差异并不显著; CH-R和SH-R种群羧酸酯酶比活力均明显高于SZ-S种群, 分别为SZ-S种群的4.61和2.18倍, 且CH-R种群的 K_m 仅为SZ-S种群的1/20; 酸性磷酸酯酶和碱性磷酸酯酶比活力种群间无明显差异; CH-R种群的几丁质酶活力降低48%, 酚氧化酶活力降低60%。说明小菜蛾对定虫隆的抗性机制具有多因子性, 多功能氧化酶解毒代谢能力的提高可能是主导抗性机制之一, 羧酸酯酶、几丁质酶和酚氧化酶也参与了小菜蛾对定虫隆的抗性。

关键词 小菜蛾, 定虫隆, 抗性机制

苯甲酰基脲类(benzoylphenyl ureas, 简称BPUs)杀虫剂作为菊酯类药剂的替代产品, 于1989年在我国引进使用, 其作用机制独特, 防效高, 尤其对抗性小菜蛾 *Plutella xylostella* (L.) 效果更佳, 随之大量推广。但因过于单一的频繁使用, 小菜蛾的抗性問題日渐突出, 在深圳^[1]、上海^[2]和武汉^[3]等地区相继有小菜蛾对BPUs抗药性的报道。我国台湾省和国外学者对小菜蛾BPUs抗性的生化机制^[4~6]和抗性遗传特点^[7]作了一些研究, 而国内的研究尚处于抗性监测阶段, 特别是BPUs的靶标敏感性有无变化, 国内外抗性机制研究中均未涉及。

本文以定虫隆(chlorfluazuron)汰选的小菜蛾抗性种群(CH-R), 并以上海田间种群(SH-R)作为参比种群, 重点研究其抗性生化机制, 并对BPUs的可能作用靶标几丁质酶和酚氧化酶作了初步研究。旨在为BPUs进一步的毒理学和抗性机理的研究提供理论依据, 从而更好地服务于生产。

* 国家“九五”攻关项目

** 现为中国农业大学应用化学系博士生

*** 现工作单位为中国农业科学院植物保护研究所

1997-11-25收稿, 1998-04-10收修改稿

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

相对敏感种群 (SZ-S), 1990 年采自深圳市, 于室内连续饲养约 6 年, 未经任何药剂汰选; 抗性种群 (CH-R), 用定虫隆对 SZ-S 种群汰选所得, 与 SZ-S 种群相比, 抗性指数为 23.78 倍; 上海田间种群 (SH-R), 1996 年 10 月采自上海市郊田间, 与 SZ-S 种群相比, 对定虫隆的抗性指数为 9.16 倍, 作为参比种群。

试虫的饲养: 采用蛭石萝卜苗法^[8]。

1.2 供试药剂及试剂

定虫隆 (chlorfluazuron) 抑太保 5% EC, 日本石原产业株式会社; 甲基茴香醚, 上海试剂厂; N-乙酰葡萄糖胺和 NADPH, 美国 Sigma 公司; 甲壳素, 北京通县育才精细化工厂; 儿茶酚, 北京军事医学科学院供应站。

1.3 生化测定方法

1.3.1 多功能氧化酶 (MFO) O-脱甲基活力测定: 参照 Yao 方法^[9]。

1.3.2 羧酸酯酶 (CarE) 活力测定: 参照 Van Asperen 方法^[10]。

CarE 动力学常数 (K_m 和 V_{max}) 测定: 测定 7 个底物浓度下酶反应的初速度, 以 Lineweaver-Burk 作图法, 求出 K_m 和 V_{max} 。

1.3.3 酸性磷酸酯酶 (ACP) 和碱性磷酸酯酶 (AKP) 活力测定: 参照慕立义方法^[11]。

1.3.4 几丁质酶 (Chitinase) 活力测定: 取即将化蛹的小菜蛾幼虫约 100 头, 在冰盘上切取中段, 拉出中肠, 剩余表皮纵剖, 在 0.04 mol/L、pH6.6 的 PBS 中清洗 2 次, 冰浴匀浆, 定容至 4 mL, 于 4℃ 下, 10 000 r/min 离心 30 min, 取上清液作为酶源。

几丁质酶活力测定, 参照 Ishaaya & Casida 方法^[12], 并稍作修改。反应混合液含 1.0 mL 酶液、1.0 mL 0.5% 胶体几丁质和 1.5 mL PBS (0.1 mol/L、pH6.6), 于 37℃ 恒温水浴反应 60 min, 随后加入 0.5 mL Folin-酚试剂甲, 并于 100℃ 加热 10 min。冷却、离心以除去未分解的几丁质, 上清液于 400 nm 处比色。几丁质酶的活性表示为 $\mu\text{molNAGA}/(\text{mg}\cdot 60\text{ min})$ 。以 N-乙酰葡萄糖胺 (NAGA) 作标准曲线, 计算几丁质酶活力。

0.5% 胶体几丁质的制备: 称取 0.5 g 几丁质, 加入冷的浓 HCl 约 40 mL, 振荡 10 min, 不溶的物质以双层纱布过滤, 滤液中不断加入 12.5 mol/L NaOH (约 40 mL), 直到 pH7.0, 用蒸馏水定容至 100 mL。

Folin-酚试剂甲: (1) 4.0% Na_2CO_3 (2) 0.2 mol/L NaOH (3) 1.0% $\text{CaSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (4) 2.0% 酒石酸钾钠。使用前将 (1) 和 (2)、(3) 和 (4) 等体积混合, 然后将 (1) + (2) 和 (3) + (4) 按 50:1 比例混合。

1.3.5 酚氧化酶 (Phenol oxidase) 活力测定: 以 0.2 mol/L、pH7.0 的 PBS 为匀浆液, 其它同几丁质酶液的制备。

酚氧化酶活力测定, 参照 Ishaaya & Casida 方法^[12]。取 2.0 mL 0.2 mol/L PBS (pH7.0) 和 0.5 mL 0.0125 mol/L 的儿茶酚, 加蒸馏水 1.0 mL, 混匀, 于 25℃ 保温 5 min, 加入 0.5 mL 酶液反应 15 min, 于 410 nm 处比色。酚氧化酶的活性表示为 OD/(mg·15 min)。

1.3.6 蛋白质含量测定: 参照 Lowry 的 Folin-酚法^[13]。

2 结果与分析

2.1 多功能氧化酶 (MFO)

表 1 多功能氧化酶 O-脱甲基活力比较

Table 1 Comparison of MFO O-demethylation

种群 Population	比活力(μmol/(mg·30min)) Specific activity	R/S
SZ-S	0.4392 ± 0.0160	1.00
CH-R	0.8781 ± 0.0085	2.00*
SH-R	0.4726 ± 0.0134	1.08

* 差异显著性, P<0.05

表 1 显示出两个抗性种群 MFO 的 O-脱甲基活性表现不同, SH-R 种群的比活力与 SZ-S 种群的无明显差异; 而 CH-R 种群的比活力却有明显提高, 为 SZ-S 种群的 2 倍, 说明 MFO 可能是 CH-R 种群的主导抗性机制之一, 在 SH-R 种群中 MFO 的 O 脱甲基作用比较弱, 但是 MFO 的抑制剂 PBO 却有明显的增效作用

(15 倍), 这可能与 MFO 酶系的底物类型专一性有关。另一方面也说明, 在 SH-R 和 CH-R 种群中具有不同类型的 MFO, MFO 不同的同工酶造成 SH-R 和 CH-R 种群抗性水平的不同。

2.2 羧酸酯酶 (CarE)

从表 2 中可以看出, CH-R 和 SH-R 种群羧酸酯酶的比活力均明显高于 SZ-S 种群, 分别是 SZ-S 种群的 4.61 和 2.18 倍。CH-R 种群的 K_m 值为 0.0018 mmol/L, 与 SZ-S 种群具有 20 倍的差异, 说明 CH-R 种群较高的羧酸酯酶活性与其体内羧酸酯酶性质的变化有关。SH-R 种群的 K_m 值和 V_{max} 变化趋势与 CH-R 相同, 但与 SZ-S 种群相比, 差异并不显著。

2.3 酸性磷酸酯酶 (ACP) 和碱性磷酸酯酶 (AKP)

酸性磷酸酯酶 (ACP) 和碱性磷酸酯酶 (AKP) 广泛存在不同种类昆虫中, 它们参与中间代谢, 对昆虫的生长发育和变态起着重要作用, 几丁质合成抑制剂除了使昆虫蜕皮过程受阻外, 同时造成幼虫历期延长, 幼虫不能进一步发育而死亡。吴秋雁^[14]认为, 这种现象是因为抑制了昆虫体内 ACP 和 AKP 的活力, 两种磷酸酯酶的活性比较见表 3 和表 4。以 α -萘酚磷酸钠为底物, CH-R 和 SH-R 种群的酸性磷酸酯酶比活力分别为 SZ-S 种群的 1.23 和 1.30 倍, 碱性磷酸酯酶分别为 SZ-S 种群的 1.03 和 1.23 倍; 以对-硝基苯磷酸二钠为底物, CH-R 和 SH-R 种群的酸性磷酸酯酶分别为 SZ-S 种群的 1.05 和 1.26 倍, 碱性磷酸酯酶活性分别为 SZ-S 种群的 1.10 和 1.48 倍。通过两种底物测试, 抗性种群 ACP 和 AKP 活性的变化趋势相同, 均高于 SZ-S 种群, 但种群间无显著差异。因此 ACP 和 AKP 可能不是小菜蛾对 BPUs 主要的抗性机制。

2.4 几丁质酶和酚氧化酶

从表 5 可以看出，CH-R 种群的几丁质酶和酚氧化酶比活力均显著低于 SZ-S 种群，分别为 SZ-S 种群的 0.52 和 0.40 倍；SH-R 种群的酚氧化酶活力亦有降低，是 SZ-S 种群的 0.86 倍。

表 2 羧酸酯酶比活力及动力学常数比较

Table 2 Comparison of carboxylesterase activity and kinetic constant						
种群 Population	比活力(μmol/(mg·30 min)) Specific activity	R/S	K_m (mmol/L)	S/R	V_{max} (μmol/(mg·30 min))	R/S
SZ-S	0.0979 ± 0.0092	1.00	0.0385	1.00	0.0547	1.00
CH-R	0.4590 ± 0.0081	4.61 *	0.0018	20.46 *	0.0897	1.64 *
SH-R	0.2130 ± 0.0209	2.18 *	0.0367	1.05	0.0592	1.08

* 差异显著性, $P < 0.05$

表 3 酸性磷酸酯酶活性比较

Table 3 Comparison of acid phosphatase activity				
种群 Population	α-NP (μmol/(mg·30 min)) Specific activity	R/S	PNPP (μmol/(mg·30 min)) Specific activity	R/S
SZ-S	0.0855 ± 0.0107	1.00	5.0351 ± 0.0445	1.00
CH-R	0.1052 ± 0.0108	1.23	5.2863 ± 0.0879	1.05
SH-R	0.1111 ± 0.0260	1.30	6.3560 ± 0.4652	1.26

注:α-NP 为 α-萘酚磷酸钠；PNPP 为对-硝基苯磷酸二钠。表 4 相同

表 4 碱性磷酸酯酶活性比较

Table 4 Comparison of alkaline phosphatase activity				
种群 Population	α-NP (μmol/(mg·30 min)) Specific activity	R/S	PNPP (μmol/(mg·30 min)) Specific activity	R/S
SZ-S	0.4082 ± 0.0129	1.00	0.4391 ± 0.0746	1.00
CH-R	0.4391 ± 0.0926	1.03	0.4862 ± 0.0199	1.10
SH-R	0.5005 ± 0.0467	1.23	0.6500 ± 0.0869	1.48

表 5 几丁质酶和酚氧化酶活性比较

Table 5 Comparison of chitinase and phenol oxidase activity				
种群 Population	几丁质酶比活力(μmol/(mg·60 min)) Specific activity of chitinase	R/S	酚氧化酶比活力(OD/(mg·15 min)) Specific activity of phenol oxidase	R/S
SZ-S	7.4977 ± 0.0153	1.00	1.3800 ± 0.0154	1.00
CH-R	3.8624 ± 0.0146	0.52 *	0.5489 ± 0.0132	0.40 *
SH-R	—	—	1.1828 ± 0.0176	0.86

* 表示差异显著性, $P < 0.05$

3 讨论

3.1 多功能氧化酶

小菜蛾具有非常高效和可诱导的复杂的多功能氧化酶系统，对氨基甲酸酯、拟除虫

菊酯和 BPU 的高水平抗性多与 MFO 酶系密切相关。Lin^[15]室内汰选的对伏虫隆产生 36 倍抗性的小菜蛾种群, MFO 的艾氏剂环氧化酶 (AE) 活性有 3 倍的变化。并用一系列的试卤灵作为模式底物, 测定单加氧酶的活性, 发现抗性品系试卤灵 O-去甲基酶 (MROD)、试卤灵 O-去乙基酶 (EROD)、乙氧香豆素 O-去乙基酶 (ECOD) 活性分别为敏感品系的 28、11 和 23 倍。本研究测定 MFO O-脱甲基活性, 其活性为 SZ-S 种群的 2 倍, 二者差异显著, 说明 MFO 酶系氧化代谢活性的增强是 CH-R 种群的主导抗性机制。在其它一些抗 BPU 昆虫体内, 如家蝇 *Musca domestica* 和墨西哥棉铃象甲 *Anthonomus grandis*, MFO 也是代谢抗性的主要机制^[16]。

3.2 羧酸酯酶

羧酸酯酶 (CarE) 属于 B-酯酶, 又称脂肪酯酶, 这类酯酶具有广泛的底物专一性和重迭性。Miyata 等^[17]将 CarE 的特异性抑制剂 TPP 与¹⁴C 标记的定虫隆按 1:1 (w/w) 混合, 研究其代谢, 发现抗性种群 CarE 的主要代谢产物显著减少, 认为 CarE 对定虫隆降解作用的增强是小菜蛾对定虫隆抗性的最重要的机制。本研究中 CH-R 种群 CarE 比活力提高 3.6 倍, 动力学研究发现, CH-R 种群的 K_m 值比 SZ-S 种群降低近 20 倍, 说明 CH-R 种群的 CarE 对杀虫剂底物具有更大的亲合力。

3.3 几丁质酶和酚氧化酶

目前, 关于 BPU 类杀虫剂的作用机制理论不少于 10 种, 但都因缺乏足够的证据而难以定论。对其抗性机制的研究, 有可能为其毒理机制提供间接的依据。BPU 杀死昆虫的效应是在蜕皮期几丁质的减少, 对此有两种解释, 即两个学说。一个学说是: 几丁质合成酶受到抑制, 从而影响几丁质的形成。另一个学说是: 几丁质的形成没有受到影响, 几丁质的减少是由于分解几丁质的几丁质酶活性的加强^[18]。Ishaaya & Casida^[12]报道灭幼脉处理家蝇幼虫后, 几丁质酶和酚氧化酶的活性都有增加, 吴刚和尚稚珍^[19]利用定虫隆处理亚洲玉米螟幼虫也得到类似结果。几丁质酶活性的增强, 使得几丁质分解代谢加快, 破坏了体内原有的几丁质分解与合成的动态平衡, 干扰蜕皮过程中表皮几丁质的沉积, 导致几丁质含量的减少, 从而干扰新表皮的形成。酚氧化酶活性的增加, 使幼虫表皮变黑, 则会影响内表皮的弹性和牢固性。本研究通过测试这两种酶的活力, 发现 CH-R 种群几丁质酶和酚氧化酶活力比 SZ-S 种群分别降低 48% 和 60%。由此可以推知, 两种酶活力下降, 相应地 CH-R 种群小菜蛾表皮几丁质的含量将有所增加, 几丁质是昆虫表皮的主要成分之一, 几丁质含量的增加, CH-R 种群体壁的结构将随之发生变化, 其物理屏障的功能将得到加强, 这是否影响到药剂对表皮的穿透性, 值得我们在今后工作中加以考虑。正如 Fauziah^[5]认为, 小菜蛾对 BPU 抗性并不排除表皮穿透性的降低。另一方面, 昆虫在蜕皮期间表皮中几丁质被降解, 并被吸回皮细胞, 在沉积新表皮时被再度利用^[20]。几丁质酶活性的降低, 会造成新表皮的前体物质形成缓慢, 导致发育历期的延长; 而酚氧化酶活性降低, 表皮鞣化速度减慢, 也将影响表皮的性质和虫体的发育进程。这些因素将不利于小菜蛾适应复杂多变的环境条件。因此, 几丁质酶和酚氧化酶活性的降低在小菜蛾 BPU 抗性机制中的作用尚需进一步的研究探讨。

参 考 文 献

- 1 王维专, 陈伟平, 卢叔勤等. 广州、深圳地区小菜蛾对定虫隆、Bt 的抗性监测. 植物保护学报, 1993, 20 (3): 273~276
- 2 赵建周, 朱国仁, 剧正理等. 上海地区小菜蛾抗药性的动态监测及其应用. 植物保护研究进展. 北京: 科学技术出版社, 1995. 353~357
- 3 朱树勋, 司升云, 吴世雄等. 武汉地区小菜蛾田间抗药性监测. 植物保护, 1995, 27 (2): 29~30
- 4 Perng F S, Yao M C, Hung C F *et al.* Teflubenauron resistance in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol., 1988, 81 (5): 1 277~1 282
- 5 Fauziah I, Wright D J. Synergism of teflubenauron and chlorfluazuron in laboratory and acylurea-resistance field strain of *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Yponomeutidae). Pestic. Sci., 1992, 34: 221~226
- 6 Ku C C, Chiang F M, Hsin C Y *et al.* Glutathione transferase isozymes involved in insecticide resistance of diamondback moth *Plutella xylostella* L. to insecticide in Thailand. Appl. Entomol. Zool., 1995, 30 (4): 557~566
- 7 Cheng E Y, Kao C H, Chiu C S. Insecticide resistance study in *Plutella xylostella* L. X. IGR resistance and the possible management strategy. J. Agric. Res. China, 1990, 39: 208~220
- 8 刘传秀, 韩招久, 李凤良等. 应用蛭石萝卜苗法室内继代大量繁殖小菜蛾的研究. 昆虫知识, 1994, 30 (6): 341~343
- 9 Yao M C, Hung C F, Sun C N. Fenvalerate resistance and aldrin epoxidation in larvae of the diamondback moth. Pestic. Biochem. & Physiol., 1988, 30: 272~278
- 10 Asperen van K. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. J. Insect Physiol., 1962, 8: 401~416
- 11 慕立义. 植物化学保护研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1994. 151~154
- 12 Ishaaya I, Casida J E. Dietary TH 6040 alters composition and enzyme activity of housefly larval cuticle. Pestic. Biochem. & Physiol., 1974, 4: 484~490
- 13 Lowry O H, Rosebrough N J, Randall R L. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193: 265~275
- 14 吴秋雁. 灭幼脲 1 号对致倦库蚊幼虫磷酸酯酶活力的影响. 昆虫学报, 1990, 35 (3): 306~311
- 15 Lin J G, Hung C F, Sun C N. Teflubenzuron resistance and microsomal monooxygenases in larvae of the diamondback moth. Pestic. Biochem. Physiol., 1989, 35: 20~25
- 16 Ishaaya I. Insect resistance to benzoylphenylureas and other insect growth regulators mechanisms and countermeasures. In: Christopher A M eds. Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. 1992, 230~246
- 17 Miyata T, Fahmy A R, Rahman T *et al.* Enhanced chlorfluazuron degradation by carboxylesterase as a mechanism of chlorfluazuron resistance in diamondback moth. In: Eighth IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry. Washington D C, 1994, July 4~9, 211
- 18 张宗炳. 昆虫毒理学的新进展. 北京: 北京大学出版社, 1982. 39~53
- 19 吴 刚, 尚雅珍. 抑太保对亚洲玉米螟表皮酚氧化酶及几丁质酶活力的影响. 昆虫学报, 1992, 35 (3): 306~311
- 20 王荫长. 昆虫生理生化学. 北京: 中国农业出版社, 1994. 12~14

STUDIES ON BIOCHEMICAL MECHANISMS OF CHLORFLUAZURON RESISTANCE IN DIAMONDBACK MOTH, *PLUTELLA XYLOSTELLA* (L.)

Wu Qingjun Zhu Guoren Zhao Jianzhou

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Zhang Xing

(Northwestern Agricultural University, Yangling 712100)

Gao Xiwu

(Department of Entomology, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract The mechanisms of chlorfluazuron resistance in diamondback moth (DBM) (*Plutella xylostella* L.) were investigated in a chlorfluazuron-selected strain (CH-R) and a field population collected from Shanghai (SH-R) in October 1996, with 9.16-folds resistance to chlorfluazuron. The results showed that: (1) The activities of MFO in O-demethylation increased 2.00 and 1.08-folds in CH-R and SH-R strains, respectively, compared with the SZ-S strain. (2) There were differences in quality and quantity of CarE between CH-R and SZ-S strains. The K_m value of CH-R strain was 20.46 times lower than that of the SZ-S strain, suggesting that the property of CarE in CH-R strain was altered. But there was no significant difference between SH-R and SZ-S strains in K_m and V_{max} values. (3) Difference of phosphatase activities between SZ-S and CH-R or SH-R strains was not significant. (4) The activities of cuticle chitinase and phenol oxidase were decreased by 48 % and 60 %, respectively, compared with the SZ-S strain.

Key words *Plutella xylostella*, chlorfluazuron, resistance mechanism